

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 381—387

## Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung<sup>1)</sup>

Von F. ERHARDT, I. MARSCHNER, RENATE C. PICKARDT und P. C. SCRIBA

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn) München

(Eingegangen am 15. März/7. Juni 1973)

Durch Messung der Reaktionskinetiken von  $^{125}\text{J}$ -TSH mit Anti-H-TSH bei verschiedenen Temperaturen wurde die Inkubation bei Raumtemperatur als optimal erkannt. Die Präzipitationsreaktion mit Anti- $\gamma$ -Globulin erfolgt bei den meisten der geprüften Chargen bei Raumtemperatur komplett innerhalb weniger Stunden. Die Anwendung von niedrig markiertem  $^{125}\text{J}$ -TSH (20—70 mCi/mg) führt wegen der gut erhaltenen Immunreaktivität des Tracers zu empfindlichen Eichkurven, und im Vergleich zu Wiederfindekurven in Humanserum richtigen TSH-Werten. Durch Wiederfindekurven in Serum erreichen wir einen Interassay-Variationskoeffizienten von etwa 10 Prozent und verbessern dadurch die relative Richtigkeit der gefundenen TSH-Werte.

### *Improvement and quality control of the radioimmunological TSH determination*

The reaction kinetics of  $^{125}\text{I}$ -TSH with Anti-H-TSH were studied at different temperatures, and the incubation was found to be optimal at room temperature. The precipitation reaction with anti- $\gamma$ -globulin is complete in most of the cases investigated within a few hours. The use of low labelled  $^{125}\text{I}$ -TSH (20—70 mCi/mg) leads to higher sensitivity, because of the scarcely altered immunoreactivity of the tracer, and, with comparison of recovery curves in human serum, to more accurate TSH values. Recovery curves in serum reduce the interassay variation coefficient to about 10% and improve the relative accuracy of the TSH values found.

Seit UTIGER, ODELL und CONDLIFFE 1963 zum ersten Mal die radioimmunologische Bestimmung von H-TSH<sup>2)</sup> beschrieben (1), sind eine Reihe methodischer Arbeiten erschienen, in denen durch Tracer-Nachreinigung (2), Verwendung von H-TSH-armen Humanseren für die Standardkurven (3, 4) und Einsatz sehr niedriger Mengen von hoch markiertem H-TSH (3, 5) Empfindlichkeit und Richtigkeit der TSH-Bestimmung gesteigert werden. Die Vorinkubation wird nicht von allen Autoren als wirksames Mittel zur Steigerung der Empfindlichkeit anerkannt (5). Eine Inkubationszeit von 5 bis 7 Tagen bei 4°C zur Erreichung des Reaktionsgleichgewichtes ist die Regel. Wir haben einige Parameter der radioimmunologischen H-TSH-Bestimmung systematisch untersucht, um optimale Reaktionsbedingungen zu erhalten und zugleich einen Vorschlag zur relativen Richtigkeitskontrolle erarbeitet.

### Material und Methoden

#### *Puffer* (alle pH 7.4)

Puffer A-Stammlösung: 10-fache Konzentration: 0,15 mol/l Phosphat, 1,5 mol/l NaCl, 2 g Merthiolat/l, 20 g Rinderalbumin/l (Pentex, Fluka, Buchs, Schweiz), 0,1 mol/l EDTA.

Puffer A-Gebrauchslösung: Stammlösung mit dest. Wasser 1:10 verdünnen.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51).

<sup>2)</sup> Abkürzungen: H-TSH = humanes Thyreotropin; HCG = humanes Choriongonadotropin; T = Gesamtradioaktivität per Probe; B = gebundene Radioaktivität;  $B_0$  = Standard-Leerwert; N = unspezifische Bindung (+ Nullrate des Gammazählers);  $K_{\text{niedrig}}$  = TSH-Werte des Kontrollserums mit niedrigem TSH-Gehalt;  $K_{\text{hoch}}$  = TSH-Werte des Kontrollserums mit hohem TSH-Gehalt; AK = Antikörper; TRH = Thyreotropin Releasing Hormone.

Puffer B: Puffer A ohne EDTA, dazu 40 g Rinderalbumin (Pentex) auf 1 l Gebrauchslösung.

Puffer C: 0,15 mol/l NaCl, 0,015 mol/l Natriumphosphatpuffer.

Puffer D: 0,4 mol/l Natriumphosphatpuffer.

#### *AK1-Lösung* = Anti-H-TSH (für 100 Proben)

50  $\mu\text{l}$  Anti-H-TSH 1:100 (in dieser Konzentration eingefroren gelagert (NIAMD, Bethesda)), 1000 E HCG (Primogon, Schering AG, Berlin), 40  $\mu\text{l}$  Kaninchen-Normalserum, ad 60 ml mit Puffer A auffüllen.

Für die Messung der unspezifischen Bindung (N) benötigt man die Lösung ohne Anti-TSH (Tab. 1).

*AK2-Lösung* = Zweiter Antikörper (präzipitierender Antikörper) Anti-Rabbit-Precipitating-Serum, Donkey, Fa. Wellcome, Lot. K 3437 1:50 oder Lot. K 6042 1:25 mit Puffer A verdünnen. Bei allen neuen Chargen muß das Optimum der Verdünnung und der Inkubationszeit neu festgestellt werden.

#### *TSH-Standard*

Von einer H-TSH-Stammlösung (Human Pituitary TSH 68/38, NIMR, Mill Hill, London) mit 10 mE/ml werden 0,2 ml mit Puffer B auf 20 ml aufgefüllt (Standardlösung 100  $\mu\text{E}/\text{ml}$ ) und eine Verdünnungsreihe erstellt (Abb. 3), die in Portionen zu 0,8 ml eingefroren wird.

Durch Zufügen von H-TSH-Standard zu Serum eines Patienten, dessen eigener TSH-Spiegel durch  $T_3$ -Behandlung (100  $\mu\text{g}/\text{Tag}$ ) supprimiert ist, stellt man sich eine Wiederfindekurve (Abb. 6) her.

#### *TSH-Markierung* mit $^{125}\text{J}$ nach GREENWOOD et al (6)

mit  $\text{Na}^{125}\text{J}$  zur Proteinmarkierung (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main oder The Radiochemical Centre Amersham, England).

2,5  $\mu\text{g}$  TSH (NIAMD, Bethesda) werden mit 0,5 mCi  $^{125}\text{J}$ , 30  $\mu\text{g}$  Chloramin T und 20  $\mu\text{l}$  Puffer D in einem Gesamtvolumen von 40  $\mu\text{l}$  5 bis 15 s geschüttelt. Die Reaktion wird mit 60  $\mu\text{g}$  Natriummetabisulfit in 20  $\mu\text{l}$  Puffer C gestoppt, das Gemisch auf die Säule gebracht und das Reaktionsgefäß mit 500  $\mu\text{g}$  KJ in 50  $\mu\text{l}$  dest. Wasser nachgespült.

Tab. 1  
Pipettier- und Inkubationsschema

	Probe	N	Leerwert
1. Tag			
Serum bzw. Standard	200 $\mu$ l	—	—
Puffer B	—	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
AK 1-Lösung mit Anti-TSH	600 $\mu$ l	—	600 $\mu$ l
AK 1-Lösung ohne Anti-TSH	—	600 $\mu$ l	—

mit Dilutor\* zusammen pipettieren (gute Durchmischung) und etwa 44 h bei 18–25°C (Raumtemperatur) inkubieren. Verschuß der deckellosen Eppendorfgläser während der Inkubationszeiten mit Selbstklebefolie.

3. Tag  
 $^{125}$ J-TSH (Tracer) überall 100  $\mu$ l

mit Hamilton-Spritze zufügen (gute Durchmischung), anschließend etwa 60 h bei Raumtemperatur inkubieren.

6. Tag  
AK 2-Lösung überall 200  $\mu$ l

mit Hamilton-Spritze zufügen, anschließend 3 h bei Raumtemperatur inkubieren. Von etwa zehn Proben wird die Gesamtaktivität gemessen. Dann werden sämtliche Proben 5 min lang bei 6000 g zentrifugiert, die Überstände (automatisch\*\*) abgesaugt und die Rückstände 1 min im Gamma-Zählgerät\*\*\* gezählt.

\* Fisons-Diluter, Fa. Ima, München.

\*\* Apparatur unter Verwendung einer 25 Kanal-Mikropumpe (Ismatec, Zürich), die dankenswerterweise von Herrn Dr. Ing. H. SCHWAB, SFB 51, München, gebaut wurde.

\*\*\* Gamma-Zählgerät: Gammaguard, Tracerlab.

Die Isolierung des Tracers erfolgt durch Säulenchromatographie an albumindesaktiviertem Sephadex G 75 (8  $\times$  150 bis 200 mm). Die TSH-Fraktion mit der höchsten Aktivität und die beiden folgenden werden sogleich auf etwa 250 000 Imp./min pro ml mit Puffer A verdünnt und bei –30°C eingefroren. Die Lösung kann bis zu drei Wochen lang verwendet werden, wenn die spezifische Aktivität 70 mCi/mg TSH nicht übersteigt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt aus eingesetzter TSH- und  $^{125}$ J-Menge (unter Zugrundelegung der Aktivitätsangaben des Isotopen-Herstellers) und aus dem Aktivitätsverhältnis von TSH- und Jodid-Fraktion nach der Säulenchromatographie.

#### Methode (Tab. 1)

In jeder Serie laufen folgende Proben neben den Serumwerten mit:

1. Sechs Proben ohne Antikörper zur Messung der unspezifischen Bindung N.
2. Je drei Proben von zwei Kontrollseren mit einem niedrigen TSH-Gehalt (2–5  $\mu$ E/ml) und einem höheren Wert (etwa 25  $\mu$ E/ml) am Anfang und am Ende eines Durchgangs.
3. Zehn Punkte der Standardkurve in Dreifachwerten.
4. Neun Punkte einer Wiederfindungskurve von TSH-Standard in  $T_3$ -supprimiertem Patienten-Serum in Dreifachwerten.
5. Neun Einzelwerte des Standard-Leerwertes zur Berechnung der unteren Nachweisgrenze.

#### Auswertung

Nach Abzug der unspezifischen Bindung (N) wird die Impulszahl des Standard-Leerwertes gleich 100% gesetzt ( $B_0$ ). Man erhält eine Eichkurve mit der Abszisse  $\mu$ E/ml und mit der Ordinate

$$\frac{B - N}{B_0 - N} \times 100 [\%].$$

## Ergebnisse

### Temperaturabhängigkeit und Inkubationszeiten

#### Kinetik der Bindung von $^{125}$ J-TSH an Anti-TSH-Serum bei verschiedenen Temperaturen

Die Kinetiken (Abb. 1a) zeigen, daß das Gleichgewicht auch nach 140 h bei keiner Temperatur ganz erreicht wird, daß die Reaktion bei 20°C doppelt so schnell verläuft wie bei 4°C und daß die höchste Bindung bei 20°C erreicht wird. Die unspezifische Bindung bleibt bei allen Temperaturen bei 2,5% der Gesamtaktivität konstant.

Abbildung 1b zeigt, daß die niedrige Lage des 37°C-Plateaus bei 22°C in Richtung geringerer Dissoziation verschoben wird, doch wird das 22°C-Plateau nicht ganz

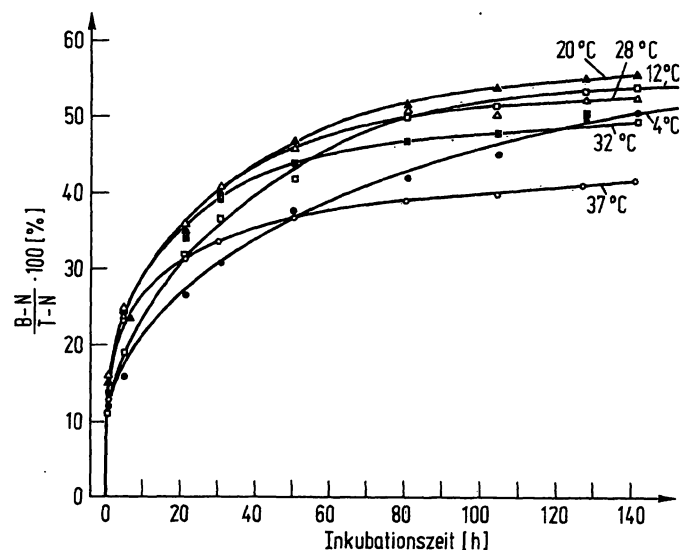


Abb. 1a

Kinetik der Bindung von  $^{125}$ J-TSH an Anti-TSH-Serum bei verschiedenen Temperaturen  
Im Kühlraum bei +4°C wurden 120 identische Proben mit je 0,2 ml Puffer B, 0,1 ml  $^{125}$ J-TSH (spezifische Aktivität 112 mCi/mg, 25 000 Imp./min, 450 pg) und 0,6 ml Anti-TSH pipettiert. Je 20 Proben wurden dann bei 4, 20, 28, 32 und 37°C gleichzeitig inkubiert. In den angegebenen Zeitintervallen, zuletzt nach 140 h, wurden je 2 Proben entnommen und bei –30°C eingefroren. Sämtliche Proben wurden gleichzeitig 3 Minuten lang bei 28°C aufgetaut und mit je 0,2 ml AK 2-Lösung versetzt

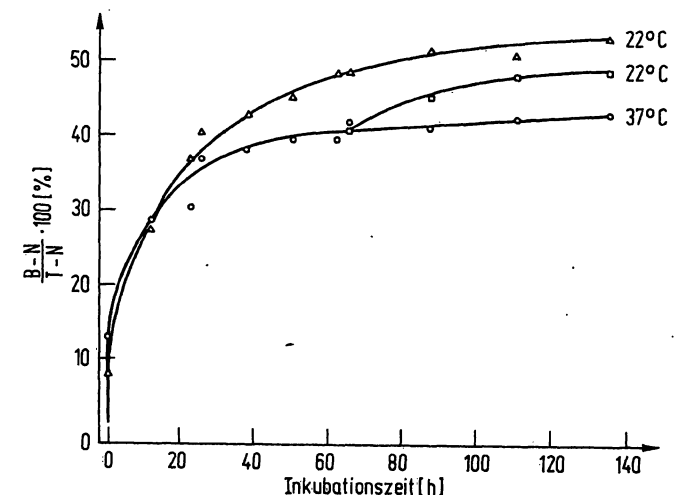


Abb. 1b

Einfluß der Dissoziation auf die Bindung von  $^{125}$ J-TSH bei 37°C  
Ansatz wie Abb. 1a. Nach 65 h wurden 4 Doppelproben von 37°C nach 22°C überführt

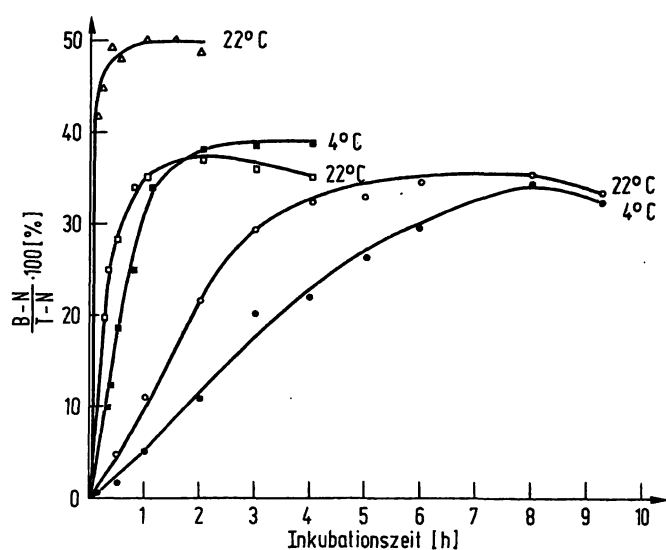


Abb. 2

Kinetiken der Fällungsreaktion mit Anti- $\gamma$ -Globulinen verschiedener Chargen bei Raumtemperatur und bei 4°C  
 20 Proben mit 0,2 ml Puffer B wurden 48 h lang mit 0,1 ml Tracer und 0,6 ml AK 1-Lösung inkubiert. Dann wurden je 0,2 ml AK 2-Lösung optimaler Konzentration zugesetzt. In bestimmten Zeitabständen wurden je 2 Proben entnommen und sofort zentrifugiert  
 $\triangle$ — $\triangle$  (Wellcome Lot K 3437, Verdünnung 1:50)  
 $\square$ — $\square$  (Wellcome Lot K 6042, Verdünnung 1:25)  
 $\circ$ — $\circ$  (Antibody Incorp. Lot 11.16.72, Verdünnung 1:64)

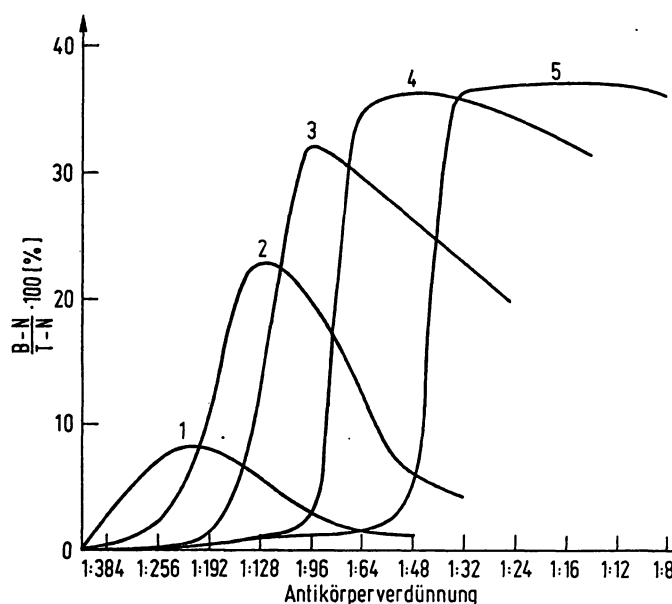


Abb. 3

Optimierung der Fällung mit Anti-Kaninchen-Präzipitationsserum (Wellcome: Lot 6042)  
 Kurven 1 bis 5 unterscheiden sich durch die Mengen Normal-Kaninchen-serum per Probe  
 (1 = 0,025  $\mu$ l; 2 = 0,05  $\mu$ l; 3 = 0,1  $\mu$ l; 4 = 0,2  $\mu$ l; 5 = 0,4  $\mu$ l)  
 Ordinate: % Bindung  
 Abszisse: Antiserum-Verdünnung (davon 0,1 ml per Probe)

erreicht. Das bedeutet, daß  $^{125}$ J-TSH bei 37°C in 65 h auch immunologische Aktivität verliert. Die niedrigere Lage des 37°C-Plateaus (Abb. 1a und 1b) setzt sich also aus Dissoziationsgleichgewicht und „Damage“ zusammen.

#### Kinetiken der Fällungsreaktion mit Anti- $\gamma$ -Globulinen verschiedener Chargen

Die Präzipitation mit 2. Antikörper bei Raumtemperatur dauert je nach Charge zwischen 5 min und einigen Stunden. Bei 4°C erfolgt die Präzipitation im allgemeinen wesentlich langsamer (Abb. 2).

Nicht zuletzt aus Gründen der Wirtschaftlichkeit lohnt es sich, das günstigste Verhältnis zwischen Kaninchen-Normalserum und AK 2-Verdünnung auszutesten. Abbildung 3 zeigt, daß man durch Verwendung von nur 0,2  $\mu$ l Kaninchen-Serum per Probe mit der Hälfte des teuren 2. Antikörpers auskommt, ohne dadurch die Menge an gefällter Aktivität merklich zu verringern.

#### Einfluß der Vorinkubation auf die Empfindlichkeit

Abbildung 4 zeigt vier Standardkurven verschiedener Steilheit, sowie deren untere Nachweisgrenzen. Diese berechnen wir aus der Streuung des Standardleerwertes, indem wir den dreifachen Variationskoeffizienten von  $B_0$  ( $B_0 = 100\%$ ) abziehen und den entsprechenden TSH-Wert auf der Standardkurve ablesen.

Diese liegen in dieser Versuchsserie nach heißer Vorinkubation bei 10  $\mu$ E TSH/ml (A), nach gleichzeitiger Inkubation bei 2  $\mu$ E TSH/ml (B), nach 44 h kalter Vorinkubation bei 0,7  $\mu$ E TSH/ml (C) und nach 140 h kalter Vorinkubation bei 0,4  $\mu$ E TSH/ml (D).

Die Vorinkubation mit kaltem Hormon steigert die Empfindlichkeit also bedeutend. Es muß betont werden, daß die spezifische Aktivität des eingesetzten Tracers

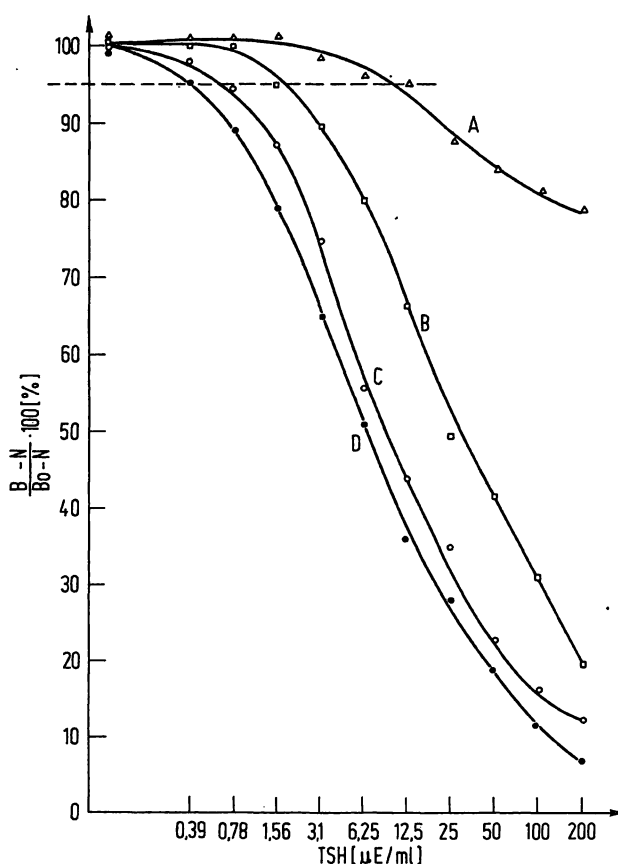


Abb. 4

Einfluß der Vorinkubation auf Standardkurven in Puffer B  
 Spezifische Aktivität des  $^{125}$ J-TSH = 36 mCi/mg; 22600 Imp./min per Probe = 1250 pg  
 A: 44 h Vorinkubation mit Tracer und Antikörper 1; anschließend 63 h Inkubation mit Standard ( $\triangle$ — $\triangle$ )  
 B: 63 h gleichzeitige Inkubation von Tracer, Standard und Antikörper 1 ( $\square$ — $\square$ )  
 C: 44 h Vorinkubation von Standard und Antikörper 1; anschließend 63 h mit Tracer ( $\circ$ — $\circ$ )  
 D: 140 h Vorinkubation mit Standard und Antikörper 1; anschließend 63 h mit Tracer ( $\bullet$ — $\bullet$ )  
 Die gestrichelte Linie zeigt die untere Nachweisgrenze für alle 4 Kurven

nur 36 mCi/mg betrug, entsprechend  $\sim 1250$  pg TSH pro Probe.

#### Einfluß der spezifischen Aktivität des $^{125}\text{J}$ -TSH auf die Haltbarkeit des Tracers

Eine Charge mit 5 mCi  $\text{Na}^{125}\text{J}$  (Angabe des Herstellers) wurde in Portionen zu 1 mCi aufgeteilt und durch Variation der Reaktionsbedingungen  $^{125}\text{J}$ -TSH mit spezifischen Aktivitäten von 43, 123 und 220 mCi/mg hergestellt. Aliquots der Tracer wurden anschließend über 4 g Cellulose in Säulen von  $15 \times 50$  mm (Avicel, Merck) nachgereinigt und die  $^{125}\text{J}$ -TSH enthaltenden Fraktionen auf 360000 Imp./min · ml verdünnt. Der Rest wurde unverdünnt und ohne weitere Nachreinigung über Cellulose bei  $-30^\circ\text{C}$  eingefroren. Um eine zu hohe Markierung des TSH zu vermeiden, markieren wir üblicherweise  $2,5 \mu\text{g}$  TSH mit 0,5 mCi  $\text{Na}^{125}\text{J}$  und Chloramin T 5–15 s lang. Wir haben die Konzentrationsabhängigkeit der Zersetzungsreaktion verschieden hoch markierter Tracer untersucht. Dazu wurde frisch markiertes TSH auf Gebrauchskonzentration verdünnt und in konzentriertem Zustand (unverdünnte Fraktionen nach Sephadex-Chromatographie des Markierungsgemisches) bei  $-30^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach zwei Wochen wurde das Material durch Rechromatographie über kurze Sephadex G 75-Säulen ( $15 \times 75$  mm) untersucht.

Tabelle 2 zeigt, daß sich das Verhältnis von  $^{125}\text{J}$ -TSH-Peak zu Jodid-Peak bei konzentrierter Aufbewahrung zu Ungunsten des J-TSH-Anteils verändert, während der Jodid-Anteil schneller zunimmt. Niedrig markierter Tracer (43 mCi/mg) spaltet bei gleicher Aktivität per Volumeneinheit (360000 Imp./min · ml) nur 12% Jodid in 14 Tagen ab, weshalb der Tracer unter unseren Bedingungen drei Wochen lang ohne Nachreinigung verwendbar bleibt.

Mit den 3 Tracern verschiedener spezifischer Aktivität (Abb. 5) wurden Standardkurven in Puffer B und in TSH-armem Serum simultan angesetzt. Das mit 43 mCi/mg niedrig markierte TSH mit einem  $\frac{B_0}{T}$  von 42% wird wesentlich besser gebunden als drei- und fünffach so hoch markiertes TSH (123 und 220 mCi/mg), obwohl bei gleicher Aktivität nur etwa 1/3 bzw. 1/5 der  $^{125}\text{J}$ -TSH-Menge per Probe eingesetzt wurde. Dies zeigt, daß die Immunoaffinität mit zunehmender Markierung abnimmt.

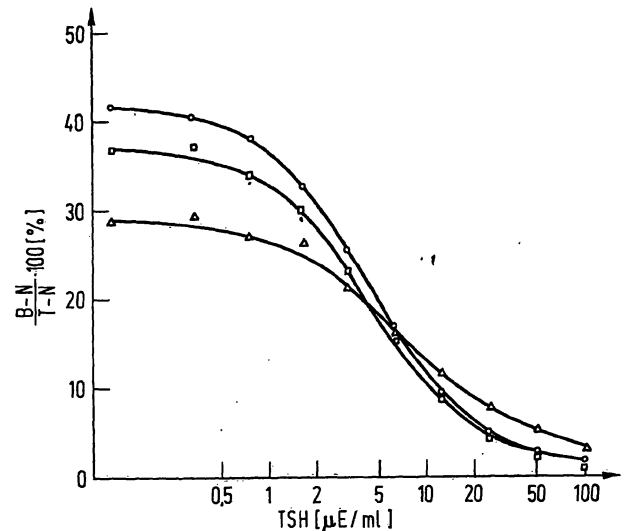


Abb. 5  
Standardkurven in Puffer B mit  $^{125}\text{J}$ -TSH bei verschiedener spezifischer Aktivität  
Spezifische Aktivitäten: 43 mCi/mg (O—O), 123 mCi/mg (□—□), 220 mCi/mg (△—△)

#### Bedeutung der spezifischen Aktivität für Empfindlichkeit und Richtigkeit der TSH-Bestimmung

Abbildung 6 zeigt Standardkurven in Puffer B und Wiederfindekurven in TSH-armem Serum. Die Standardkurve mit dem niedrigst markierten Tracer (43 mCi/mg) und die mit dem zweiten Tracer (123 mCi/mg) sind in  $\frac{B}{B_0}$ -Auftragung identisch. Die Standardkurve mit dem höchst-markierten Tracer (220 mCi/mg) verläuft nach rechts versetzt, d. h., der Assay wäre weniger empfindlich. Die Wiederfindekurven (Abb. 6) in TSH-armem Serum zeigen bei Ablesen auf den dazugehörigen Standardkurven mit zunehmender spezifischer Aktivität nicht nur höhere basale TSH-Werte, sondern (vgl. Tab. 3) auch mit der Menge TSH-Standard zunehmende Differenzen, während diese bei niedrig markiertem  $^{125}\text{J}$ -TSH innerhalb der Fehlergrenzen der Methode konstant bleiben.

In Tabelle 3 ist das Verhalten von Standard- zu Wiederfindekurven in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des eingesetzten  $^{125}\text{J}$ -TSH für 12 Assays angegeben. Man erkennt, daß niedrig markierter Tracer (von 8–67 mCi/mg) Wiederfindekurven in Humanserum liefert, die entweder mit der Standardkurve identisch sind, oder bei denen die TSH-Differenzen

Tab. 2

Bindung ( $\frac{B_0}{T}$ ) und Jodid-Abspaltung von verschieden hoch markiertem  $^{125}\text{J}$ -TSH

Das markierte TSH wurde verdünnt ( $360000$  Imp./min · ml) und konzentriert ( $3,8$ – $19,4 \times 10^6$  Imp./min · ml bei  $-30^\circ\text{C}$  eingefroren zwei Wochen gelagert

Spez. Akt. mCi/mg	Verdünnt eingefroren				Konzentriert eingefroren			
	$\frac{B_0}{T}$ [%] 21. 6. 72	$\frac{B_0}{T}$ [%] 5. 7. 72	Jodid [%] 21. 6. 72	Jodid [%] 5. 7. 72	$\frac{B_0}{T}$ [%] 21. 6. 72	$\frac{B_0}{T}$ [%] 5. 7. 72	Jodid [%] 21. 6. 72	Jodid [%] 5. 7. 72
43	41,6	33,8	<1	12	41,6	27,2	<1	47
123	36,8	22,9	<1	19	36,8	—	<1	68
220	27,8	8,9	<1	26	27,8	—	<1	77

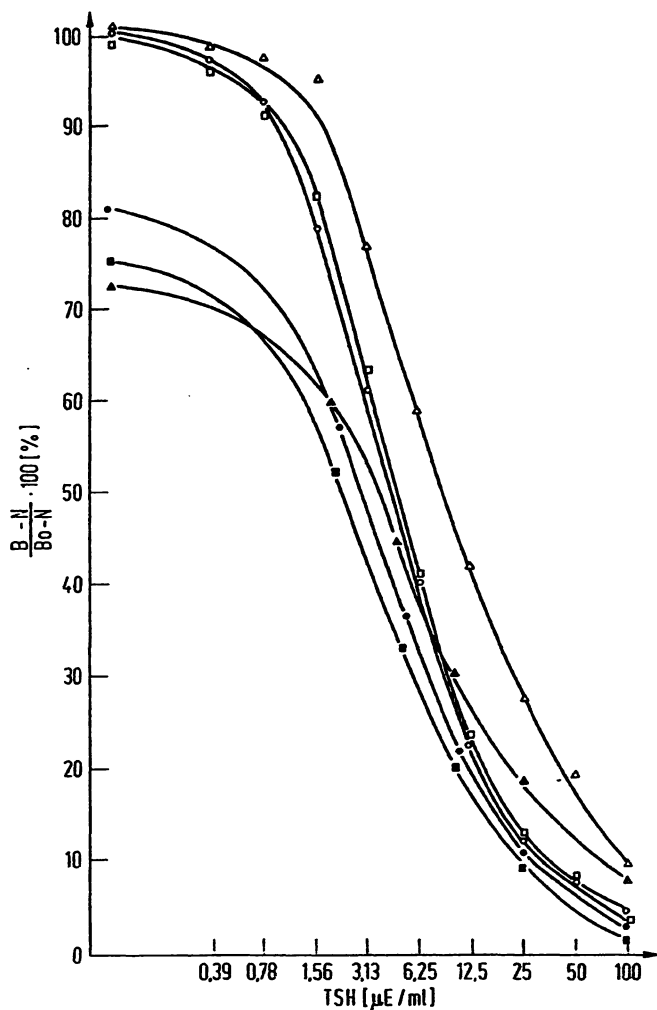


Abb. 6

Standardkurven (offene Symbole) in Puffer B und Wiederfindekurven (geschlossene Symbole) in TSH-armem Serum mit  $^{125}\text{J}$ -TSH verschiedener spezifischer Aktivität

- (○—○ ●—●) spez. Akt. 43 mCi/mg; 1700 pg/36000 Imp./min per Probe  
 (□—□ ■—■) spez. Akt. 123 mCi/mg; 600 pg/36000 Imp./min per Probe  
 (△—△ ▲—▲) spez. Akt. 220 mCi/mg; 340 pg/36000 Imp./min per Probe

Tab. 3

Differenzen ( $\Delta \mu\text{E TSH/ml}$ ) zwischen Standard- und Wiederfindekurven in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des Tracers und der Menge TSH-Standard ( $\mu\text{E/ml}$ , 5 Meßpunkte)

Spez. Aktivität mCi/mgTSH	TSH-Standard				
	$\Delta 0$	$\Delta 2$	$\Delta 5$	$\Delta 10$	$\Delta 25$
8	0,95	1,1	0,8	0,6	—0,5
36	0,4	0,7	0,9	1,5	3,5
42	0,2	—0,1	0,2	—0,6	0
42	0,15	—0,15	0,9	1,0	0,7
43*	1,5	1,5	2,0	2,5	2,5
48	0,9	0,25	0,7	3,0	3,5
48	0	—0,2	0	0,1	0
67	0,15	—0,2	—0,3	0,5	—1,2
112	2,5	2,6	3,8	17	18
123*	2	2,4	3,4	4,2	12
220*	3,6	3,9	6,2	12	20
254	6,6	8,5	9	15	30

\* Wiederfindekurven mit Tracer verschiedener spezifischer Aktivität aus einem Durchgang und einer  $\text{Na}^{125}\text{J}$ -Charge.

zwischen Standard- und Wiederfindekurve über den empfindlichen Meßbereich (bis 25  $\mu\text{E}$ ) konstant bleiben. Bei höher markiertem  $^{125}\text{J}$ -TSH (von 112–254 mCi/mg) ist die TSH-Differenz bereits größer, entsprechend dem zu hoch gemessenen TSH-Gehalt des Wiederfindeserums und steigt laufend mit zunehmender Menge TSH-Standard an. So werden z. B. bei Anwendung von  $^{125}\text{J}$ -TSH mit einer spezifischen Aktivität von 220 mCi/mg statt 25  $\mu\text{E/ml}$  TSH im Wiederfindeserum 45  $\mu\text{E/ml}$  gemessen.

In der Abbildung 7 sind gefundene gegen erwartete TSH-Werte im Wiederfinderversuch als Funktion der spezifischen Aktivität graphisch dargestellt. Mit zunehmender spezifischer Aktivität wächst die Abweichung vom 45°-Winkel.

Qualitätskontrolle durch Wiederfindekurven in Humanserum

In Tabelle 4 wurden 13 TSH-Assays bezüglich spezifischer Aktivität des eingesetzten  $^{125}\text{J}$ -TSH und Reproduzierbarkeit zweier in verschiedenem Meß-

Tab. 4

H-TSH-Kontrollwerte über 13 Assays ohne und mit Korrektur durch den Regressionskoeffizienten

Assay No	Spez. Akt. mCi/mg TSH	Regression B	K niedrig	K niedrig B	K hoch	K hoch B
1	36	1,124	4,5	4,0	26	23,1
2	67	0,955	3,55	3,72	23,4	24,5
3	67	0,821	3,7	4,5	19,8	24,1
4	48	0,896	3,05	3,4	18	20,1
5	40	1,144	4,95	3,51	24	21
6	40	1,229	4,95	3,84	24	18,5
7	40	1,049	3,7	3,52	25	23,8
8	40	0,983	3,7	3,76	25	25,4
9	73	1,883	6,6	3,51	40,5	21,5
10	120*	1,12	4,15	3,71	23,5	21,0
11	300*	1,278	6,15	4,8	29,8	23,2
12	120	1,196	4,1	3,09	27	22,6
13	300	1,658	6	3,62	30,5	18,4
$\bar{x}$			4,6	3,77	26,13	22,1
S			1,13	0,44	5,77	2,14
VK [%]			24,6	11,7	22,1	9,7

\* Über Discelektrophorese gereinigtes  $^{125}\text{J}$ -TSH.

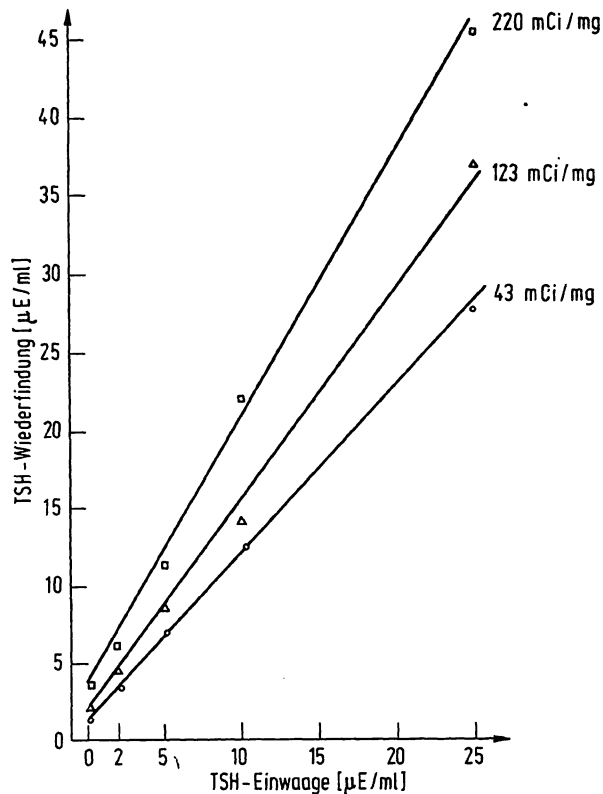


Abb. 7

TSH-Wiederfindung in Humanserum in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des  $^{125}\text{J}$ -TSH

bereich gelegener Kontrollwerte verglichen. Weiter wurde für jeden Durchgang der Regressionskoeffizient für die Gerade, die bei Auftragen von Standard- gegen Wiederfindenkurve (Abb. 7) resultiert, berechnet.

Die Kontrollwerte wurden mit diesem Regressionskoeffizienten korrigiert und schließlich die Variationskoeffizienten der Kontrollwerte vor und nach dieser Korrektur verglichen.

Die Regressionskoeffizienten schwanken zwischen 0,82 und 1,88, wobei im Mittel bei Tracer mit spezifischer Aktivität über 100 mCi/mg TSH 30% zu hohe TSH-Werte gemessen werden. Die Interassay-Variationskoeffizienten der Kontrollwerte sinken im Mittel nach der Korrektur mit Hilfe des Regressionskoeffizienten für jeden Durchgang um mehr als einen Faktor von 2.

### Diskussion

Die Kinetik der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -TSH an den TSH-spezifischen Antikörper (Abb. 1) bei verschiedenen Temperaturen zeigt, daß Raumtemperatur (20°C) sowohl bezüglich der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung, als auch im Hinblick auf die Höhe der Bindung ( $\frac{B_0}{T}$ ) allen anderen Temperaturen überlegen ist. Bei 20°C wird offenbar ein Optimum zwischen Reaktions- und Dissoziationsgeschwindigkeit von Antigen und Antikörper erreicht. Bei 4°C ist das „Plateau“ selbst nach sechstägiger Inkubation noch wesentlich steiler als bei allen anderen Temperaturen und das Gleichgewicht wird nicht erreicht. Bei Temperaturen über 20°C überwiegt die Dissoziation zunehmend. Das führt dazu, daß bei 37°C das „Plateau“ zwar schon nach

etwa 50 h erreicht wird, aber eine etwa 15% niedrigere Bindung als bei 20°C resultiert (Abb. 1).

Die Kinetik der Fällungsreaktion mit dem 2. Antikörper (Abb. 2) bei Raumtemperatur zeigt, daß es sich hier um eine rascher verlaufende Reaktion handelt. Die je nach verwendeter Anti- $\gamma$ -Globulin-Präparation gefundenen Unterschiede machen es erforderlich, die optimale Verdünnung und die Kinetik für jede neue Charge zu prüfen und eventuell das angegebene Inkubations-Schema (Tab. 1) zu adaptieren. Wir sehen keinen Grund dafür, die Präzipitationsreaktion prinzipiell „klassisch“, d. h. bei 4°C über 12 oder mehr Stunden ablaufen zu lassen (Abb. 3).

Die Optimierungsversuche in Abbildung 3 zeigen für jede Kaninchenserum-Konzentration eine optimale Antikörper-Konzentration, bei der die maximale Fällung erfolgt. Eine Erhöhung der Antikörper-Konzentration führt zu einer Abnahme des radioaktiven Präzipitats. Wir führen diesen Effekt auf die Polyvalenz der präzipitierenden Antikörper zurück und auf die Notwendigkeit, mehr als ein  $\gamma$ -Globulin-Molekül per Anti- $\gamma$ -Globulin binden zu müssen, damit der Antigen-Antikörper-Komplex ausfällt.

Die Vorinkubation von 1. Antikörper mit kaltem Hormon ist in bezug auf die Empfindlichkeit der Methode (untere Nachweisgrenze) allen übrigen geprüften Inkubationsbedingungen überlegen (Abb. 4). Durch längere Vorinkubation kann die untere Nachweisgrenze weiter herabgesetzt werden. Wenn wir mit dieser Feststellung im Gegensatz zu anderen Autoren stehen (5), so möglicherweise deshalb, weil von diesen bei 4°C und nicht bei der optimalen Temperatur von 20°C mit einem  $^{125}\text{J}$ -TSH-Tracer gearbeitet wurde, der in der Regel mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 100 mCi/mg nach unseren Erfahrungen übermarkiert ist.

Mit einer zu hohen Markierung nimmt die immunologische Aktivität von  $^{125}\text{J}$ -TSH gegenüber nicht markiertem H-TSH ab. Nach unseren Ergebnissen ist es optimal, einen  $^{125}\text{J}$ -TSH-Tracer zu verwenden, der mit etwa 20–70 mCi/mg nach „klassischen“ Vorstellungen niedrig markiert ist. Niedrig markiertes  $^{125}\text{J}$ -TSH ist erstens stabiler gegenüber strahlenchemischer Zersetzung und wird zweitens trotz mehrfach höherer Konzentration per Probe besser vom Antikörper gebunden. Dieser Effekt tritt noch deutlicher in Erscheinung, wenn man nicht die Impulsrate, sondern die Tracermenge konstant hält. Drittens liefert niedrig markierter Tracer gleich empfindliche Standardkurven und ergibt viertens richtigere TSH-Werte als  $^{125}\text{J}$ -TSH, das mit mehr als 100 mCi/mg markiert ist. Erst bei ganz niedrigen spezifischen Aktivitäten, wie z. B. 8 mCi/mg, sinkt, wie zu erwarten, die Empfindlichkeit der TSH-Bestimmung wegen der hohen Tracer-Konzentration im Assay ab (50% Intercept 45  $\mu\text{E}$  TSH/ml gegenüber 6–9  $\mu\text{E}$  TSH/ml bei 20–70 mCi/mg) allerdings ohne Verlust der Richtigkeit (Tab. 3), da die Wiederfindenkurve mit der Eichkurve nahezu identisch verläuft. Wir kommen ferner zu der Erkenntnis, daß es zu-

mindest bei  $^{125}\text{J}$ -TSH günstiger ist, sofort nach der Markierung in Gebrauchskonzentration (pro ml etwa 250 000 Imp./min) und tiefgefroren aufzubewahren, als konzentriert einzufrieren und jedesmal vor Gebrauch nachzureinigen.

Die bessere relative Richtigkeit, d. h. in bezug auf den verwendeten Standard, wird bewiesen durch die Konstanz der Differenzen zwischen Standard und Wiederfindungskurven (Tab. 3) über den empfindlichen Meßbereich. Die in der Literatur (1, 5, 7) häufig beschriebenen Differenzen zwischen TSH-Werten in Pufferlösungen mit Rinderalbuminzusatz und in Humanserum finden ihre Erklärung durch die Verwendung von zu hoch markiertem TSH. Sie treten entweder gar nicht oder viel schwächer bei Verwendung von TSH-Tracer geringerer spezifischer Aktivität auf.

Das Mitführen von Wiederfindungskurven in gepooltem oder supprimiertem Humanserum in jedem Assay

gestattet nicht nur den systematischen Fehler besser zu erfassen, als dies durch Kontrollseren allein möglich ist, sondern zudem die Korrektur des gesamten Assays. Dies kommt klar zum Ausdruck durch die Verbesserung des Interassay-Variationskoeffizienten für die Kontrollseren. Die Tabelle 4 zeigt zudem, daß der mittlere Regressionskoeffizient für niedrig markierten Tracer (36–67 mCi/mg) mit 1,025 dem Idealwert von 1,0 sehr nahekommt.

Aufgrund der hier mitgeteilten methodischen Verbesserungen liegt der Normalbereich der basalen TSH-Spiegel ( $\bar{x} \pm 2s$ ) jetzt zwischen 0 und  $3,8 \mu\text{E/ml}$  und damit niedriger als der früher mitgeteilte Bereich von  $1\text{--}7 \mu\text{E/ml}$  (8). Der Anstieg der TSH-Spiegel nach Stimulation von Kontrollpersonen mit  $200 \mu\text{g}$  TRH i. v. blieb mit einem  $\Delta\text{TSH}_{30 \text{ min}}$  von  $2,7\text{--}23,6 \mu\text{E/ml}$  ( $\bar{x}_{\log} \pm 2s$ ) praktisch gleich (8).

### Literatur

1. UTIGER, R. D., ODELL, W. D. & CONDLIFF, P. G. (1963), *Endocr.* 73, 359–365. — 2. GOLSTEIN-GOLAIRE, J. & VANHAELST, L. (1970), *Internat. J. Appl. Radiat. Isotop.* 21, 17–20. — 3. PATEL, Y. C., BURGER, H. G. & HUDSON, B. (1971), *J. Clin. Endocr.* 33, 768–774. — 4. HALL, R., AMOS, J. & ORMSTON, B. J. (1971), *Brit. Med. J.* 1, 582–585. — 5. VON ZUR MÜHLEN, A. & EMRICH, D. (1971), *diese Z.* 9, 257–265. — 6. GREENWOOD, F. C., HUNTER,

W. M. & GLOVER, J. (1963), *Biochem. J.* 89, 114–123. — 7. ODELL, W. D., VASTAGER, L. & BATES, R. (1968), Radioimmunoassay of human thyrotropin. In: *Radioisotopes in medicine; in-vitro studies*. US Atomic Energy Commission. — 8. PICKARDT, C. R., ERHARDT, F., GRÜNER, J. HORN, K. & SCRIBA, P. C. (1972), *Klin. Wochenschr.* 50, 1134–1137.

Prof. Dr. P. C. Scriba  
8000 München 2  
Ziemssenstr. 1